

образованием оксодигидротиохрома. Мы предполагаем, что тирозин выступает в качестве ловушки для пероксинитрита.

Другие аминокислоты, такие как триптофан и пролин, также ингибировали образование оксодигидротиохрома. Феррицианид, пероксид водорода не приводят к образованию оксодигидротиохрома.

Заключение

При инкубации нитрита с гликозилированными аминокислотами образуется оксид азота.

Максимальный выход оксида азота, вследствие восстановления нитрита гликозилированными аминокислотами, наблюдали в анаэробных условиях. В присутствии кислорода выход оксида азота снижается вследствие взаимодействия с супероксиданионами и образования пероксинитрита.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант БОЗМС-058.

Литература

1. Степура И. И., Чайковская Н.А., Водоевич В.П., Виноградов В.В. Биохимия, (1999) т. 64 с. 106-110.
2. Степура И. И. (1992) Вопросы мед. химии, т. 38, № 4, с. 26-33.
3. Koppenol, W.H., Kissner, R., and Beckman, J.S. (1996) Methods Enzymol., 269, 296-302.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУПЕРОКСИДАНИОНОВ С РИБОФЛАВИНОМ. РОЛЬ РИБОФЛАВИНА В СТАБИЛИЗАЦИИ УРОВНЯ ОКСИДА АЗОТА И НИТРОЗОТИОЛОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Адамчук Р.И., Степура А.И.

Институт биохимии НАН Беларуси, г. Гродно

The oxidized form of riboflavin effectively interacts with organic free radicals and super-oxide anions to produce a leuko-form. It can be easily oxidized by air oxygen or ferri-forms of hemoglobin and Cyt. c, to form riboflavin and hydrogen peroxide or ferro-forms of heme-containing proteins, respectively. It is proposed, that riboflavin due to the interaction with super-oxide anions can stabilize the nitrogen oxide level in the body.

Keywords: riboflavin, semiquinone and leuko-forms of riboflavin, superoxide anions, ferro- and ferri-forms of Cyt. c, hydrogen peroxide, superoxide dismutase, nitric oxide, ultrasound.

Оксид азота и его метаболиты очень эффективно реагируют с различными молекулами, такими как, ферро и ферри формы железа, как в составе гема, так и в свободном состоянии [1], с супероксидом, молекулярным кислородом [2, 3], глутатионом, цистеином, цистеиновыми остатками в белках [4].

Однако, короткое время жизни важнейшего биологического регулятора NO в тканях, равное 3-5 с, наиболее вероятно вызвано его взаимодействием с O_2^- . Оксид азота с высокой скоростью взаимодействует с супероксиданионом с образованием пероксинитрита:



Несмотря на то, что концентрация кислорода в тканях превышает на несколько порядков концентрацию супероксиданионов, реакция 1 играет основную роль в процессе убыли NO [5].

Константа скорости взаимодействия NO с супероксиданионами очень высока, и равна $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [6].

Поэтому даже небольшое изменение концентрации супероксиданионов будет сказываться на уровне NO.

Представленные результаты свидетельствуют, что рибофлавин (РФ) эффективно взаимодействует с супероксиданионами и может, вероятно, оказывать стабилизирующее воздействие на уровень NO при физиологических концентрациях или лишь несколько превышающих физиологические.

Методы исследования

Для генерации супероксиданионов использовали ультразвуковой метод, подробно описанный ранее [7]. Концентрацию окисленной формы рибофлавина и восстановленной лейко-формы определяли спектрофотометрически [7].

Результаты исследования

При воздействии ультразвука на водно-спиртовые растворы окисленной формы цитохрома с наблюдали восстановление окисленной формы гемопротенина в ферро-форму в атмосфере воздуха в присутствии кислорода (рис. 1).

В спектре ферри-цитохрома с происходят характерные изменения: полоса Сорэ сдвигается в длинноволновую область, а также появляются полосы с максимумами при 520 и 550 нм (рис. 1). При добавлении к водно-спиртовому раствору ферри-цитохрома с СОД наблюдали полное ингибирование восстановления ферри-катиона железа (табл. 1).

Дальнейшая экспозиция в ультразвуковом поле приводит к обратному процессу окисления ферро-формы цитохрома с в ферри-форму (рис. 1). Вероятно, параллельно с взаимодействием супероксиданионов с

ферри-цитохромом *c* протекает их дисмутация в пероксид водорода. Образовавшиеся пероксиды водорода играют главную роль в реокислении ферро-формы цитохрома *c* в ферри-форму. Действительно, добавление каталазы вызывало защитный эффект и ферро-форма цитохрома *c* не окислялась при экспозиции в ультразвуковом поле. Как известно, каталаза эффективно разрушает пероксиды водорода и очень медленно взаимодействует с органическими пероксидами.

Тот факт, что при добавлении в водно-спиртовый раствор каталазы полного восстановления ферри-формы цитохрома *c* достичь не удавалось (в растворе оставалось примерно 10-15% окисленной формы цитохрома *c*), вероятно, свидетельствует о протекании обратной реакции между супероксиданионами и ферро-формой цитохрома *c* с образованием ферри-формы цитохрома *c*.

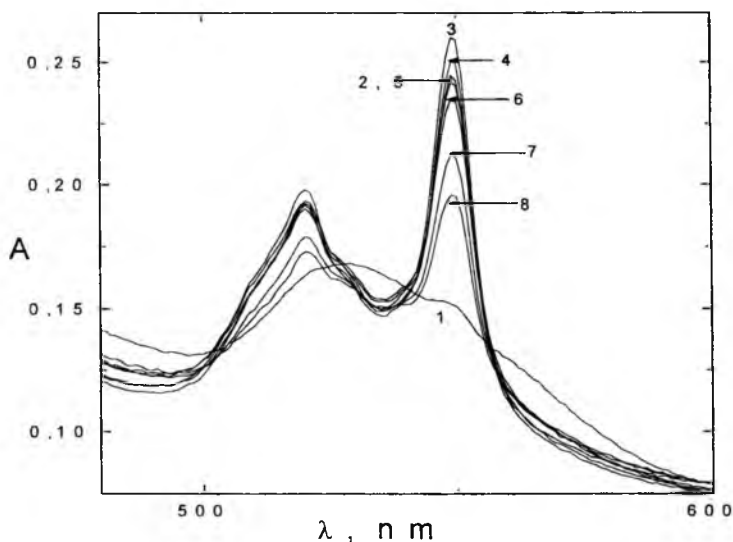


Рис. 1. Изменение спектра поглощения ферри-цитохрома *c* под действием ультразвука в водно-спиртовых растворах. Исходный ферри-цитохром *c* (1), облученный ферри-цитохром *c* в присутствии этанола в течение: -1 мин. (2), -2 мин. (3), -5 мин. (4), -10 мин. (5), -15 мин. (6), -20 мин. (7), -30 мин. (8). Концентрация этанола 1.0 М. Концентрация цитохрома *c* 10 мкМ. Интенсивность ультразвука 0,6 Вт/см².

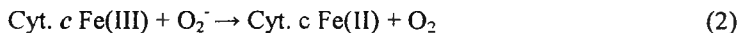
Таблица 1

Восстановление ферри-цитохрома с, под действием УЗ-ка, в ферро-форму в водно-спиртовых растворах в присутствии СОД. Начальная концентрация ферри-цитохрома с в растворе составляла 1 мкМ и принята за 100%. Концентрация этанола $3.48 \cdot 10^{-1}$ М.

Состав раствора	Активность СОД, е. а.	Количество ферро-цитохрома с, в %
Этанол+цитохром (III)	-	90
Этанол+цитохром (III) + СОД	2.0	50
Этанол+цитохром (III) + СОД	4.0	30
Этанол+цитохром (III) + СОД	8.0	2-5

Восстановление ферри-цитохрома с под действием ультразвука в ферро-форму в водно-спиртовых растворах в атмосфере (рис. 1) воздуха и полное ингибирование в присутствии СОД (табл. 1) убедительно свидетельствует о генерации супероксиданионов.

Полученные результаты позволяют предположить, что ферри-форма цитохрома с восстанавливается в ферро-форму супероксиданионами при воздействии ультразвука на водно-спиртовые растворы в атмосфере воздуха.



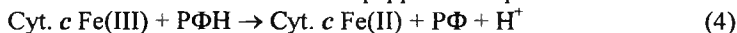
Ускорение восстановления ферри-цитохрома с супероксиданионами в присутствии рибофлавина (РФ)

При добавлении рибофлавина к водно-спиртовому раствору ферри-цитохрома с наблюдали ускорение восстановления ферри-катиона гемопротейна в ультразвуковом поле.

Ускорение восстановления ферри-формы цитохрома с в присутствии рибофлавина в атмосфере O_2 , вероятно, связано с тем, что рибофлавин взаимодействует с супероксиданионами с образованием семихинонной формы рибофлавина (РФН).



А затем РФН восстанавливает ферри-цитохром с:



В присутствии рибофлавина тормозится реакция дисмутации супероксиданионов, катализируемая супероксиддисмутазой (СОД), и уменьшается выход пероксида водорода



Как известно, пероксиды водорода играют главную роль в реокислении ферро-формы цитохрома с в ферри-форму.

Поэтому в присутствии рибофлавина наблюдали не только ускорение восстановления ферри-цитохрома, но и возрастание доли восстановленного ферри-цитохрома с. При высоких концентрациях рибофлавина наблюдали практически полное восстановление ферри-цитохрома с в ферро-форму в ультразвуковом поле. В отсутствие рибофлавина ферри-цитохром с не восстанавливался полностью в ультразвуковом поле в ферро форму.

Как указывалось ранее, в присутствии СОД (табл. 1) наблюдали полное ингибирование восстановления ферри-цитохрома с. Это вызвано тем, что СОД катализирует реакцию дисмутации супероксиданионов с образованием пероксида водорода (реакция 5) и супероксиданионы не взаимодействуют с ферри-цитохромом с (протекание реакции 2 тормозится).

После добавления рибофлавина даже в присутствии СОД наблюдали в условиях наших опытов восстановление до 30-35% ферри-цитохрома с в ферро-форму. Это связано с протеканием реакции 3, в которой рибофлавин конкурирует с СОД за супероксиданионы. Образовавшаяся семихинонная форма рибофлавина восстанавливает ферри-цитохром с (реакция 4).

Лейкоформа и семихинонная форма РФ в свою очередь взаимодействуют также с метгемоглобином и восстанавливают его в дезоксиформу.

Концентрация NO в тканях обычно составляет 10-100 нМ [5]. Концентрация супероксиданионов в тканях изменяется в широких пределах, но низка по абсолютному значению. В норме концентрация РФ в цельной крови составляет примерно 2-3 мкМ [8].

Концентрация оксида азота в тканях снижается при окислительном стрессе вследствие повышения уровня кислородных свободных радикалов, главным образом, супероксиданионов и протекания реакции очень быстрого взаимодействия между оксидом азота и супероксиданионами, что приводит к образованию пероксинитрита (реакция 1).

Рибофлавин выступает как ловушка супероксиданионов (реакция 3). Вклад рибофлавина в снижение уровня супероксиданионов особенно возрастает при уменьшении активности СОД.

Как известно, супероксиданионы взаимодействуют с GSNO с образованием нитрата и окисленной формы глутатиона.

Поэтому можно предположить, что РФ может выполнять в организме роль антиоксиданта при окислительном стрессе, снижать уровень супероксиданионов и, следовательно, оказывать стабилизирующий эффект на уровень оксида азота и S-нитрозотиолов при окислительном стрессе и выступать как модулятор сигналов оксида азота.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант Б01-339.

Литература

1. Davis K.L., Martin E., Turko I.V. and Murad F. (2001) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 203-236.
2. Wink D.A., Darbyshire J.F., Nims R.W. (1993) *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 23-27.
3. Ingarro L.J., Fukuto J.M., Griscavage J.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8103-8107.
4. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1620-1624.
5. Czapski G. and Goldstein S. (1995) *10-International Congress of Radiation Research. Congress Lecture*, Vol. 2: (Hagen U., Harder D., Jung U., Streffer C. eds.) Wurzburg, Germany, pp. 228-232.
6. Huie R.E. and Padmaja S. (1993) *Free Rad. Res. Comms.*, 18, 195-199.
7. Степура И.И., Адамчук Р.И., Степура А.И. *Биофизика* (2002), т. 47, № 6, с. 903-913.
8. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. (1981) *Основы биохимии*, Мир, Москва, т. 3.

КОРРЕКЦИЯ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ: РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЕГО ДЕЙСТВИЯ

Беляева Л.Е., Шебеко В.И., Солодков А.П.

Государственный медицинский университет, г. Витебск

N-acetylcysteine is a thiol-containing drug with antioxidant capacity, widely used in pulmonology. Nevertheless, N-acetylcysteine (NAC) has a number of other unique properties. When infused in the blood, NAC is rapidly “ingested” by endotheliocytes and altered their reduced/oxidized glutathione ratio by stimulating glutathione synthesis. The ratio between reduced and oxidized glutathione is thought to be a “switcher”, determining redox-state and cellular response to different stimuli acting on cells. Moreover, NAC can influence both constitutive and inducible NO-synthase activity. In addition to this action, NAC can affect L-arginine transport into endothelium. This agent also can change bioavailability of nitric oxide and cause formation of S-nitrosothiols. These data indicate that NAC may be useful in the correction of oxidative and nitrosative stress which lead to endothelial dysfunction.

Our group have received results demonstrating that NAC influenced endothelium-depending coronary vessels' tone dysregulation following severe posthemorrhagic arterial hypotension. NAC (40 mg/kg, intraperitoneally) diminished excessive shear-stress induced coronary vasodilatation and reduced the